

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **02000418 A**

(43) Date of publication of application: **05.01.90**

(51) Int. Cl. **C12N 1/16**
// C12N 15/81
(C12N 1/16 , C12R 1:865)

(21) Application number: **63283716**

(22) Date of filing: **11.11.88**

(30) Priority: **13.11.87 JP 62285175**

(71) Applicant: **TAKEDA CHEM IND LTD**

(72) Inventor: **NAKAHAMA KAZUO**
KAISEI YOSHIHIKO
YOSHIMURA KOJI

(54) **ENHANCEMENT OF MANIFESTATION OF GENE**

(57) Abstract:

PURPOSE: To enhance the manifestation of heterogene in yeast by using the respiratory defective strain of the yeast transformed with manifestation plasmid of gene.

CONSTITUTION: The manifestation of gene is enhanced by using yeast (except *Saccharomyces cerevisiae* AH22R

strain) defective in respiratory ability transformed with DNA containing the heteroprotein gene for the yeast. Said gene is e.g. human lysozyme gene, human EGF gene. Said yeast is e.g. *Saccharomyces cerevisiae* NA74-3A(p), *Saccharomyces cerevisiae* K33-7B(p), *Saccharomyces cerevisiae* NA87-11A(p), *Saccharomyces cerevisiae* NAX-50D(p).

COPYRIGHT: (C)1990,JPO&Japio

⑫ 公開特許公報(A) 平2-418

⑮ Int. Cl.⁵ 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 平成2年(1990)1月5日
 C 12 N 1/16 K 7421-4B
 // C 12 N 15/81 ZNA
 (C 12 N 1/16
 C 12 R 1:865) 6712-4B
 審査請求 未請求 請求項の数 6 (全17頁)

⑭ 発明の名称 遺伝子の発現を高める方法

⑯ 特 願 昭63-283716

⑰ 出 願 昭63(1988)11月11日

優先権主張 ⑱ 昭62(1987)11月13日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭62-285175

㉑ 発 明 者 中 浜 一 雄 京都府長岡京市西の京15番地の59
 ㉒ 発 明 者 改 正 善 彦 大阪府堺市浜寺元町3丁332番地
 ㉓ 発 明 者 吉 村 浩 二 大阪府大阪市東淀川区瑞光1丁目6番31号 武田薬品瑞光
 荘内
 ㉔ 出 願 人 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町2丁目3番6号
 ㉕ 代 理 人 弁理士 大多和 明敏 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

遺伝子の発現を高める方法

2. 特許請求の範囲

- (1) 酵母にとって異種の蛋白質の遺伝子を含む DNA で形質転換させ、かつ呼吸能が欠損した酵母 (ただし、サッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH 2 2 R⁻株を除く)。
 (2) 遺伝子がヒトリゾチーム遺伝子またはヒト EGF 遺伝子である特許請求の範囲第1項記載の酵母。
 (3) 遺伝子の発現に用いるプロモーターが、グリセラルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GLD) 遺伝子、酸性フォスファターゼ遺伝子 (PHO 5) またはウリジナーニリン酸ガラクトース-4-エピメラーゼ遺伝子 (Gal 10) のプロモーターである特許請求の範囲第1項記載の酵母。
 (4) 酵母がサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) NA 74-3 A (p⁻)、サッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevi-*

isae) K 33-7 B (p⁻)、サッカロミセスセレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) NA 87-11 A (p⁻) またはサッカロミセスセレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) NA X-50 D (p⁻) である特許請求の範囲第1項記載の酵母。

- (5) 酵母にとって異種の蛋白質の遺伝子を含む DNA で形質転換させ、かつ呼吸能が欠損した酵母 (ただし、サッカロミセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH 2 2 R⁻株を除く) を培養し、培養物中に蛋白質を生成蓄積させることを特徴とする酵母にとって異種の蛋白質の製造法。
 (6) 蛋白質がヒトリゾチームまたはヒト EGF である特許請求の範囲第5項記載の蛋白質の製造法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は遺伝子の発現を高める方法に関する。
 〔従来の技術〕

近年、遺伝子組換え技術を用いて、酵母で有用蛋白質を生産させるための研究がさかに行なわれている。これは遺伝子によっては、大腸菌など

の原核生物では不可能であった発現が、真核生物である酵母を用いることによって可能になったためであり、その例の1つとしては免疫原性のあるB型肝炎ウイルス表面抗原の発現がある。また、ヒトリゾチームの様にジスルフィド結合が多い蛋白を生産させる場合には、大腸菌や枯草菌を用いた菌体内あるいは分泌発現では不活性型のヒトリゾチームとして生産されるが、酵母を用いた分泌発現では、活性型のヒトリゾチームとして生産される〔吉村等 (Yoshimura, K., et al.), 「バイオケミカル アンド バイオフィジカル リサーチ コミュニケーション (Biochem. Biophys. Res. Commun.)」, 146, 712 (1987)〕。

〔発明が解決しようとする問題点〕

しかし、一般に酵母における異種遺伝子の発現量は大腸菌に比べて低く、従って酵母における遺伝子発現量を高めることは、異種蛋白質の工業生産にとって極めて重要である。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者らは、サッカロミセス セレビスエ

(*Saccharomyces cerevisiae*) AH 2 2 R⁻株 (IFO 10134, FRI FERM BP-804) が他の酵母よりも遺伝子の発現量が高いことを見出し、サッカロミセス セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH 2 2 R⁻株の性質を研究した結果、驚くべきことにこの株は呼吸欠損株であることを見出し、さらに他の酵母についても鋭意研究を重ねた。その結果、本発明者らは、遺伝子の発現プラスミドで形質転換させた酵母 (組換え体) の呼吸欠損株 (ρ^-) がその親株 (ρ^+) よりも遺伝子の発現量が高いこと、即ち酵母の呼吸能を欠損させることによって遺伝子の発現が高まることを見出し、本発明を完成した。

酵母は嫌氣的条件でも好氣的条件でも生育が可能であり、前者の場合は細胞質内の解糖系により、後者の場合には、ミトコンドリア内の酸化リン酸化により、生育に必要なATPを獲得している。従って、ミトコンドリアDNAの一部あるいは全部を欠失させることによって呼吸欠損株 (ρ^-) を得ることが出来る (酵母の解剖、御島直彦、大嶋

泰治、大隅正子編、講談社サイエンティフィック、p 137~147, 1981年)。なお、ミトコンドリアDNAの全部が欠失した呼吸欠損株を ρ^- と表わすことがあるが、本出願では ρ^- と ρ^+ を総称して ρ^- と表わす。

即ち、本発明は酵母にとって異種の遺伝子を含むDNAで形質転換させ、かつ呼吸能が欠損した酵母 (ただし、サッカロミセス セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH 2 2 R⁻株を除く) に関するものである。

本発明の酵母菌株としては、例えばサッカロミセス セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) K 33-7 B (α leu2 his pho80 pho8), サッカロミセス セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) NA 87-11 A (α leu2 his3 trp1 pho3 pho5), サッカロミセス セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) NA 74-3 A (α leu2 his4 pho9 can1) サッカロミセス セレビスエ (*S. cerevisiae*) NA X-50 D (α leu2 his4 ura3 lys1 can1) などが挙げられる。上記のサッカロミセス

セレビスエ (*S. cerevisiae*) K 33-7 B はサッカロミセス セレビスエ (*S. cerevisiae*) NA 79-10 C [金子等 (Kaneko, Y. et al.), 「モレキュラー アンド セルラー バイオロジー (Mol. Cell. Biol.)」, 5, 248 (1985)] とサッカロミセス セレビスエ (*S. cerevisiae*) AH 2 2 R⁻ [宮之原等 (Miyanohara, A., et al.), 「プロシーディング オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci.) USA」, 80, 1 (1983)] との交雑によって作成したものであり、サッカロミセス セレビスエ (*S. cerevisiae*) NA 87-11 A はモレキュラー セルラー バイオロジー (Mol. Cell. Biol.), 4, 771 (1984) に記載されている。また、サッカロミセス セレビスエ (*S. cerevisiae*) NA 74-3 A は (財) 発酵研究所 (IPO) に IFO-10430 として保管され、また工業技術院微生物工業技術研究所 (FRI) に FERM P-9691 として寄託されている。NA X-50 D は NA 74-3 A と AX 66-1 B (α leu2 ura3 lys1 pho3) との交雑によっ